

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 MAY 1999

1399/866

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 5月22日

09/701121

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第141379号

出願人  
Applicant(s):

ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

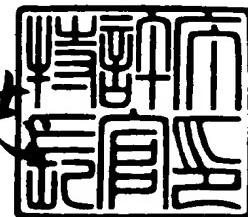
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 2月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3007333

【書類名】 特許願  
【整理番号】 DOJ-5124  
【提出日】 平成10年 5月22日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K  
【発明の名称】 新規な骨誘導活性を有する単量体蛋白質およびそれらからなる軟骨・骨疾患の予防および治療薬  
【請求項の数】 10  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台一丁目3番地2 ヘキスト・マリオン  
・ルセル株式会社創薬研究所内  
【氏名】 木村 道夫  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台一丁目3番地2 ヘキスト・マリオン  
・ルセル株式会社創薬研究所内  
【氏名】 河合 伸治  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台一丁目3番地2 ヘキスト・マリオン  
・ルセル株式会社創薬研究所内  
【氏名】 村木 祥文  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県川越市南台一丁目3番地2 ヘキスト・マリオン  
・ルセル株式会社創薬研究所内  
【氏名】 勝浦 美枝子  
【特許出願人】  
【識別番号】 596124690  
【氏名又は名称】 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100091731

【弁理士】

【氏名又は名称】 高木 千嘉

【電話番号】 03-3261-2022

【選任した代理人】

【識別番号】 100080355

【弁理士】

【氏名又は名称】 西村 公佑

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712131

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な骨誘導活性を有する単量体蛋白質およびそれからなる軟骨・骨疾患の予防および治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する蛋白質の二量体形成に係わるシステインを他のアミノ酸に置き換えたアミノ酸配列を有する単量体蛋白質。

【請求項2】 他のアミノ酸がセリン、スレオニン、アラニン、バリンからなる群から選ばれるアミノ酸である請求項1の単量体蛋白質。

【請求項3】 他のアミノ酸がアラニンである請求項1または2の単量体蛋白質。

【請求項4】 配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有する単量体蛋白質。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれかに記載の単量体蛋白質を発現しうるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞を用いて発現させる製造方法。

【請求項6】 請求項1ないし4のいずれかに記載の単量体蛋白質を有効成分とする軟骨・骨疾患の予防または治療剤。

【請求項7】 軟骨・骨疾患が骨粗鬆症である請求項6記載の軟骨・骨疾患の予防または治療剤。

【請求項8】 軟骨・骨疾患が変形性関節症または、骨関節炎である請求項6記載の軟骨・骨疾患の治療剤。

【請求項9】 軟骨・骨疾患が骨折である請求項6記載の軟骨・骨疾患の治療剤。

【請求項10】 軟骨・骨疾患が歯根・歯槽の欠損である請求項6記載の軟骨・骨疾患の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する蛋白質の二量体形成に係わるシステインを他のアミノ酸に置き換えたアミノ酸配列を有する単量体蛋白質に関する。また、本発明は上記単量体蛋白質を発現しうるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌を用いて上記蛋白質を大量かつ高純度で製造する方法に関する。また、本発明は前記単量体蛋白質からなる軟骨・骨疾患の予防または治療剤に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

現在、骨疾患の予防ないし治療剤としては、エストロゲン、カルシトニン、ビタミンD3とその誘導体およびビスホスホン酸誘導体などが知られている。また最近になってTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する骨誘導因子 (Bone morphogenic protein: 以降BMPと呼ぶ) でBMP-2からBMP-14等の一連の蛋白質に骨誘導の作用のあることが報告されている。

さらにGDF-5あるいはヒトMP52と称される蛋白質に骨誘導の作用があることが報告されている (WO 93/16099, WO 95/04819, WO 94/15949 およびNature, vol. 368, 1994, p.639-643)。成熟型ヒトMP52はN末端にアラニンを有する120残基からなる蛋白質であると考えられており、そのアミノ酸配列はこれらの特許出願に記載されている。

## 【0003】

これらの蛋白質は、天然には一個所ジスルヒド結合を有するホモダイマーとして存在する。また、それらの組み換え体蛋白質の製造に関してもそれらのホモダイマーあるいはヘテロダイマーで行われ活性をもった蛋白質が得られている。たとえば、ヒトMP52に関しては特開平9-031098で報告されている。ところでTGF- $\beta$ スーパーファミリーの受容体には2つの型が知られており、それぞれI型受容体、II型受容体と呼ばれている。これら骨誘導因子(二量体)を含むTGF- $\beta$ スーパーファミリーの受容体を介しての細胞内シグナル伝達に関してはこれらの因子がI型受容体とII型受容体の両方に同時に結合することが必要であり、さらにはそれらが1組以上集まって多量体を形成し、細胞内シグナル伝達が行われていると考えられており (Bone, vol. 19, 1996, p569-574)、こ

の多量体形成には因子が二量体であることが重要であろうと考えられているが、单量体での活性は未だ確認されていない。さらに、これら单量体としての組み換え体での製造は未だ行われていない。

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、ヒトMP52单量体を大腸菌を使って遺伝子工学的手法により大量に製造することを試みた。すなわちMP52单量体分子間のジスルヒド結合に関与している配列表配列番号1のアミノ酸配列83番のシステイン残基をアラニンに換わるようにコドンを変換した119残基よりなる配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA配列のプラスミドを構築した。さらに、このプラスミドを導入した大腸菌を用いてヒトMP52单量体を大量発現させ、さらにはリフォールディングをおこない、配列表配列番号1の蛋白質を单量体として高純度で極めて収率よく生産することを見出した。

## 【0005】

驚くべきことに、従来二量体としてのみ骨誘導活性を有すると考えられていたにもかかわらず、この单量体は、いくつかの細胞株(MC3T3-E1, ATDC5)に対し骨細胞への分化誘導活性を有することが確認された。その分化誘導活性は重量濃度あたりその二量体に比べ2倍の分化誘導活性を示すことを確認し、本発明を完成した。

## 【0006】

すなわち、本発明は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する蛋白質の二量体形成に係わるシステインを他のアミノ酸に置き換えたアミノ酸配列を有する单量体蛋白質、これらの单量体蛋白質の製造方法、及びこれらの单量体蛋白質の一種または二種以上を含有してなる軟骨・骨疾患の予防または治療用の医薬品組成物に関する。

## 【0007】

本発明は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する蛋白質の二量体形成に係わるシステインを他のアミノ酸に置き換えたアミノ酸配列を有する单量体蛋白質に関する。本発明におけるTGF- $\beta$ スーパーファミリーとはBMP-2、BMP

-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-12、BMP-13、BMP-14、ヒトMP52、GDF-5、GDF-6、GDF-7等がある。置き換えられるべき他のアミノ酸は、アミノ酸側鎖の大きさを考慮してアラニン、スレオニン、セリン、バリンからなる群から選ばれるアミノ酸であればどれでもよい。最も好ましいアミノ酸はアラニンである。

## 【0008】

本発明は、配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有する単量体蛋白質に関する。詳細には、この単量体蛋白質は分子間にジスルヒド結合を有する二量体ヒトMP52の分子間ジスルヒド結合に関与する配列表配列番号1のアミノ酸配列83番のシステインをアラニンに置き換えた蛋白質である。本発明で得られる単量体蛋白質はその二量体蛋白質より2倍の分化誘導活性を有する。

## 【0009】

また、本発明は、上記単量体蛋白質を発現しうるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞を用いて発現させる製造方法に関する。詳細には、本発明は、配列表配列番号1で示されるヒトMP52由来の119残基のタンパク質を大腸菌を用いて産生する製造方法に関する。すなわち、本発明は、配列表配列番号1で示されるヒトMP52由来の119残基のアミノ酸配列で83番目のシステインをアラニンに換えた配列をコードするDNA配列のN末端にメチオニンをコードするDNAを含有するプラスミドの構築に関する。ヒトMP52cDNAは、WO93/16099記載のcDNAを含んだプラスミドベクターを鑄型DNAとして、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）を用いて増幅した。ここで用いるPCR法とは通常核酸DNAまたはRNAの微量断片を米国特許番号4,683,195に記載されている方法で増殖することを意味する。

## 【0010】

本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列のN末端にメチオニンをコードするDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドを大腸菌に形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって変性単量体蛋白質を得

た。これを活性をもつ蛋白質に再生（リホールディング）し、さらにこれを精製し配列表配列番号1の単量体蛋白質の製造方法に関する。すなわち、本発明の単量体蛋白質は大腸菌インクルージョンボディーを可溶化した後SP-Sepharose FFカラム（ファルマシア社）およびSuperdex 200pgカラム（ファルマシア社）によりMP52変性単量体蛋白質を得た。それからリホールディングを行った後逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム（ファルマシア社）を通すことにより精製された本単量体蛋白質を得る。得られた本単量体蛋白質の物理化学的性質はN末端アミノ酸配列、アミノ酸組成および電気泳動による分析で解析する。

## 【0011】

本発明の単量体蛋白質の生物学的活性は、すでにヒトMP52二量体においてアルカリフォスファターゼ活性を上昇させる効果がみいだされている2種類の骨芽細胞株を用いてその分化誘導活性により評価した。重量濃度で比較すると本発明の単量体蛋白質は従来の二量体蛋白質に比べ2倍の活性を示した。

## 【0012】

また、本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列を有効成分とする軟骨・骨疾患の予防または治療剤に関する。詳細には、本発明の単量体蛋白質は分化誘導活性すなわち軟骨・骨誘導活性を有すると考えられるため、骨粗鬆症、先天性軟骨・骨疾患、変形性膝関節症・変形性股関節症等の変形性関節症または、骨関節炎、半月損傷等の軟骨損傷、外傷・腫瘍摘出等による骨・軟骨欠損部の再生、骨・軟骨欠損、骨折、軟骨形成不全症・軟骨発育不全症・軟骨無形成症・口蓋裂・骨形成不全症等の先天性軟骨・骨疾患、さらには、歯根・歯槽の欠損等の予防および治療剤に関する。

さらに本発明の蛋白質は軟骨・骨誘導活性を有すると考えられるため美容外科の骨移植の治療等に用いることが出来る。これらの治療には、獣医外科の領域も含まれる。

## 【0013】

全身投与方法としては静脈内、筋肉内および腹腔内投与が可能であり、静脈内投与の場合は通常の静脈内注射の他点滴静注が可能である。

注射用製剤としては、例えば注射用粉末製剤とすることができます。その場合は

適当な水溶性賦形剤例えばマンニトール、ショ糖、乳糖、マルトース、ブトウ糖、フルクトース等の一種または二種以上を加えて水で溶解し、バイアルまたはアンプルに分注した後凍結乾燥し密封して製剤とすることができます。

## 【0014】

局所投与方法としてはその部位の軟骨・骨あるいは歯の表面をコラーゲンペースト、フィブリンのりまたは他の接着剤を用いて本蛋白質で覆う方法がある。これらのうち骨移植に用いる骨は天然骨の他、従来用いられる人工骨にも利用できる。人工骨とは金属、セラミックス、ガラス等の天然素材または人工無機質素材で出来た骨を意味する。人工無機質素材として好ましくはハイドロキシアパタイトがあげられる。例えば、人工骨の内部材料に金属そしてその外側の材料にハイドロキシアパタイトを使用する。さらに、本蛋白質は骨再構築を促進するために癌性骨組織にも投与出来る。また、軟骨移植にも利用可能である。

## 【0015】

投与量については、本蛋白質の作用に影響する様々な要因、たとえば、形成が望まれる骨・軟骨の重量、骨・軟骨損傷の部位及びその状態、患者の年齢、性別、感染の重症度、投与時間および他の臨床要因を考慮して担当医が決定する。また、用量は本蛋白質との再構成に用いる担体の種類によって変動し得る。一般的に、投与量は、支持体との組成物として使用するとき、所望の骨・軟骨湿重量当たり、本単量体蛋白質として約 $10 \sim 10^6$ ナノグラム、注射剤として局所及び全身性に適用するとき、患者1人当たり $0.1 \sim 10^4$ マイクログラムを一週間に一度から一日に一度の頻度で投与することが好ましい。

## 【0016】

骨・軟骨再生に対して既知の成長因子例えばインスリン様成長因子I (insulin-like growth factor-I) 等を同時適用することにより相乗効果が期待できる。

このようにTGF-βスーパーファミリーに属する蛋白質のシステインを置換した単量体、および単量体としての工業的な規模での製造は未だ報告されておらず、軟骨・骨誘導活性を有する軟骨・骨疾患治療剤として有効である。さらに本発明の単量体蛋白質はその2量体蛋白質に比べ重量あたりの活性が2倍あり、軟骨・骨疾患治療剤の有効量を半分にすることができる。このことはTGF-βス

ーパーファミリーに属する前述の骨誘導因子の製造にも応用できる。

【0017】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0018】

実施例1 単量体ヒトMP52発現ベクターの製作

(1) 変異型ヒトMP52成熟型部分の単離

ヒトMP52の単量体は、二量体を形成すると考えられているシステイン残基を別のアミノ酸残基に改変し、ヒトMP52単量体が二量体を形成しないようにして作製した。本発明では、WO96/33215の配列表配列番号1記載のプロリンから始まる成熟型ヒトMP52の83番目のシステインのコドン(TGC)をアラニンのコドン(GCC)に変換した。

アミノ酸残基の置換は、*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.) に記載されたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による変異法 (section 8.5) を参考にし、目的の変異が導入されたPCRプライマー (順方向) を用いることにより行なった。使用したPCRプライマーの配列は、順方向プライマーとして配列番号2および逆方向プライマーとして配列番号3に記載した。

PCRは、WO96/33215に記載されたヒトMP52発現ベクター (pK0T245) を鑄型DNA (10ナノグラム) として、同じ試験管内で、順方向および逆方向プライマーそれぞれ10ピコモル、dNTP (0.4ミリモル)、MgCl<sub>2</sub> (2.5ミリモル) をLA Taq DNA ポリメラーゼ (5U、宝酒造株式会社、カタログ番号RR013A) と共に加えることにより行なった。反応は、変性 (94°C、1分間)、プライマーアニーリング (55°C、1分間)、およびプライマー伸長 (72°C、2分間) から成る各サイクルを30サイクル行なった。PCR生成物は、制限酵素NcoIとHindIIIで消化後、1.5%低融点アガロース (FMC Bioproducts社、カタログ番号5170B) 中で電気泳動により分離し、目的の約170塩基対から成るDNA断片を精製した。

## 【0019】

単量体ヒトMP52発現ベクター(pKOT279)は、上記の手法で変異を導入したNcoI-HindIIIのDNA断片を、WO96/33215に記載されたヒトMP52発現ベクター(pKOT245)を改造したヒトMP52発現ベクター(pKOT277)のNcoI-HindIII領域と交換することにより構築した。具体的には、WO96/33215に記載されたヒトMP52発現ベクター(pKOT245)のターミネーター下流に存在するMP52とは逆方向に転写されるlacZプロモーターを除去したヒトMP52発現ベクター(pKOT277)を構築し、このMP52発現ベクター(pKOT277)を制限酵素NcoIとHindIIIで消化後、1.5%低融点アガロース(FMC BioProducts社、カタログ番号5170B)中で電気泳動により分離し、目的の約2717塩基対から成るDNA断片を精製した。このDNA断片と変異を導入した約170塩基対のDNA断片をDNA Ligation Kit(宝酒造株式会社、カタログ番号6021)を用いて連結させ、単量体MP52発現ベクターを構築(pKOT279、2.9kb)し、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年2月5日に寄託した(受託番号微工研寄第FERM P-16625号)。作製した本発明の単量体MP52発現ベクターの塩基配列は、DNAシーケンサー(ファルマシア社、ALF)を用いて、目的の変異が導入されていることと生産されるヒトMP52の塩基配列(変異を導入した場所以外の配列)に誤りがないことを確認した。

## (2) 形質転換

形質転換は、Kushnerらの塩化ルビジウム法(Genetic Engineering, p.17, Elsevier(1978))に従った。即ち、pKOT279を宿主大腸菌W3110Mへ上記の手法に従い移入し、本発明の蛋白質発現大腸菌とした。

## 【0020】

## 実施例2 培養

## (1) 培養

本発明の蛋白質発現大腸菌を改変SOC培地(Bacto tryptone 20g/L, Bacto yeast extract 5g/L, NaCl 0.5g/L, MgCl<sub>2</sub> 0.95g/L, Glucose 3.6g/L)で前培養し、生産用培地(Bacto tryptone 20g/L, Citric acid 4.3g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4.675 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.275 g/L、 $\text{NaCl}$  0.865 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  0.5mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 mg/L、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.225mg/L、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_24$  0.1mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.25mg/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  6 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.2 g/L、Thiamine HCl 5.0mg/L、Methionine 2 g/L、Glucose 3 g/L)

5 Lに対し菌体懸濁液を100 mL添加し、10 Lの培養槽で通気攪拌しながら培養し、対数増殖前期 ( $\text{OD}_{550}=50$ ) に達した段階で1 mMの濃度でイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに $\text{OD}_{550}$ が150を超えるまで培養した。培養中、温度は31°C、pHはアンモニアを添加することにより7.2に制御し、溶存酸素濃度の低下を防ぐために攪拌速度をあげることにより空気飽和の50%に溶存酸素濃度を制御した。また、培養中は高菌体濃度とするために、溶存酸素濃度の急激な上昇を指標として、0.1 M リン酸を含む50%グルコース溶液をグルコース濃度が0.2%になるように添加した。

## (2) 大腸菌封入体の調製

上記方法により得られた培養液を高圧ホモジナイザー (LAB40-10RBFI, APV・ゴーリン社) に560 barで3回通すことにより菌体を破碎し、遠心して封入体を含む沈殿を回収した。

### 【0021】

## 実施例3 精製

### (1) 大腸菌封入体の可溶化

回収した封入体を1 M 尿素と5 mM EDTAを含む20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.3) で2回洗浄後、3000 xgで30分間、4°Cで遠心し、得られた沈殿を8 M 尿素、50 mM NaCl、64 mM DTT及び5 mM EDTAを含む20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.3) で超音波をかけながら可溶化した。

### (2) 変性単量体蛋白質の精製

その可溶化液を20000 xgで30分間、4°Cで遠心し、その上清を回収した。得られた上清を20 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.3、6 M 尿素、10 mM DTT、1 mM EDTAで平衡化したSP-Sepharose FF (ファルマシア社) に通し、同溶液で洗浄後、0.4 M 食塩を含む同溶液で溶出させた。溶出液を20 mM

M Tris-HCl緩衝液、pH 8.3、6M尿素、0.5M食塩、1mM EDTA、10mM DTTで平衡化したSuperdex 200pg（ファルマシア社）でゲルfiltrationを行い、单一な変性单量体蛋白質を得た。

#### (3) 再生（リホールディング）

上記で得られた変性单量体蛋白質の溶液に9倍量の50mM Na-Glycine緩衝液pH 9.8、0.5M食塩、20mM CHAPS、3mM GSSG（酸化型グルタチオン）を加えた後攪拌し20時間、4°Cでリホールディングを行った。

#### (4) 活性をもつ单量体蛋白質の精製

リホールディングされた試料を14mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>で2.8倍希釈し、等電点沈殿を行った。沈殿を3000×g 20分での集めた後、0.05%TFAに溶解した。その溶液を0.05%TFAで平衡化しておいた逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム（ファルマシア社）に通し、0.05%TFA、0～50%アセトニトリルグラジェントにより溶出した。溶出液は吸光度計を用い280nmの吸光度によりモニターし、精製された本発明の单量体蛋白質画分を得た。これに5NのNaOHをpH 6.5から7.5の間になるように加え等電点沈殿をおこなった。沈殿を10,000×g 10時間の遠心で集めた後、10mM塩酸で約3mg/mLになるように溶解させ本発明の活性をもつ单量体蛋白質を得た。

##### (イ) アミノ酸組成分析

上記で得られた精製された本発明の单量体蛋白質のアミノ酸組成をアミノ酸分析機により調べた。

##### (ウ) 電気泳動による分析

上記で得られた精製された本発明の单量体蛋白質の分子量を非還元条件下のSDS-PAGEにより確認したところ、約14kDaの分子量を示した。

上記（ア）、（イ）および（ウ）に示された結果より、本発明の单量体蛋白質はN末端が单一に配列表配列番号1で示すProから始まる119残基からなる单量体蛋白質であることが解った。

【0022】

#### 実施例4 生物学的活性の測定

マウス胚細胞由来の軟骨細胞様に分化するATDC5 (RIKEN GENE BANK, RCB 0565) と、ラット由来の骨芽細胞様性格を持つMC3T3-E1 (RIKEN GENE BANK, RCB1126) の2種類の培養細胞株を用いた、上記蛋白質のアルカリ fosfataーゼ亢進活性を指標として、その分化誘導活性として評価した。結果を図2に示す。

ATDC5は5%牛胎児血清を含むDF培地 (Gibco社) に、ROB-C26は10%牛胎児血清を含むMEM- $\alpha^-$ 培地 (Gibco社) に1mlあたり1万個の濃度で懸濁し、24ウェルプレートに1ウェルあたり1mlずつ撒き、5%CO<sub>2</sub>、37℃にて3日間培養した。

その後、血清未添加のMEM- $\alpha^-$ 培地で細胞をリノンスし、0.3%牛アルブミンを含むMEM- $\alpha^-$ 培地にて段階希釈した天然型2量体または単量体蛋白質を1ウェルあたり0.5ml加え、分化誘導を開始した。3日間培養を行った後、細胞をPBS (20mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.4) で2回洗い、250μlの細胞溶解液 (0.2%NP-40、1mM MgCl<sub>2</sub>) を加え2時間37℃に置いた。その後、破碎された細胞を含む細胞溶解液全量をマイクロチューブに移し遠心 (10,000回転、5分間) 後の上清をアッセイに用いた。

酵素活性の測定は0.1M glycine buffer, pH 10.4, 1mM ZnCl<sub>2</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>中に溶解した終濃度10mMのp-nitrophenyl phosphateを基質として、

その分解生成物であるp-nitrophenol (pNp) の405nmにおける吸光度の上昇をみることで行った。

吸光度の上昇を2分ごとに40分間モニターし直線性のみられる範囲のデータからアルカリ fosfataーゼ活性 ( $\mu M$  pNp/min) を算出した。

また、同じ上清についてBCA protein assay kit (ファルマシア社) を用いてタンパク濃度を求め、蛋白質あたりのアルカリ fosfataーゼ活性をnmol pNp/min/mg proteinとして表記した。

### 【0023】

#### 【発明の効果】

ヒトMP52由來の配列表配列番号1のアミノ酸配列を有する単量体蛋白質は

その二量体に比べ骨芽細胞株に対し2倍の分化誘導活性を有し、軟骨・骨疾患の予防または治療剤として有用である。さらに本発明の単量体蛋白質の1アミノ酸の改変はシステインを減らすことから、大腸菌を用いた大量かつ純粋な単量体蛋白質の製造をより容易にする可能性がある。

【0024】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：119

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：

生物名：ヒト (*Homo sapiens*)

組織の種類：ヒト胎児

配列の特徴：

存在位置：

他の情報：プロリンから始まる成熟型MP52の83番目のシステインのコドンをアラニンに変換したMP52アミノ酸配列。

配列：

CCA CTA GCA ACT CGT CAG GGC AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT 48

Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala

5

10

15

CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG 96

Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp

20

25

30

GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG 144

Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu

35

40

45

GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT 192

Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His

50

55

60

GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA 240

Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro			
65	70	75	80
CCC ACC GCC TGT GTG CCC ACG CGA CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC	288		
Pro Thr Ala Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe			
85	90	95	
ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC	336		
Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val			
100	105	110	
G TG GAG TCG TGT GGC TGT AGG			357
Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg			
115			

[0025]

配列番号：2

配列の長さ : 39

### 配列の型：核酸

### 鎖の数：一本鎖

## トポロジー；直鎖状

### 配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

## 組織の種類：なし

## 配列の特徴：変異導入用順方向 PCR プライマー

## 配列：

CATGCCATGG ACCCCGAGTC CACACCACCC ACCGCCTGT

[0026]

配列番号：3

配列の長さ : 37

### 配列の型：核酸

### 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

組織の種類：なし

配列の特徴：変異導入用逆方向PCRプライマー

配列：

CCCAAGCTTG CATGCCTGCC GGTCGACTAC CTACAGC

37

【図面の簡単な説明】

【図1】

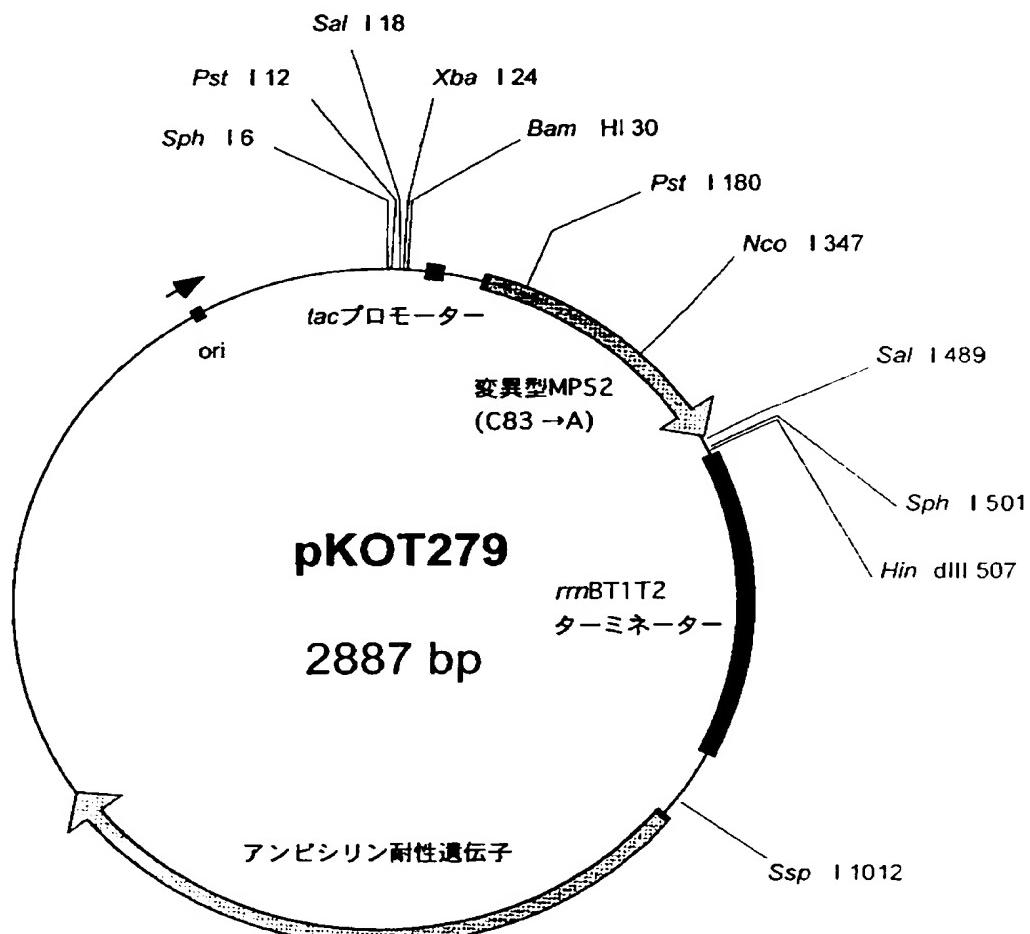
実施例1(2)で得られた本発明の蛋白質の発現ベクター(pKOT279)のプラスミドマップである。

【図2】

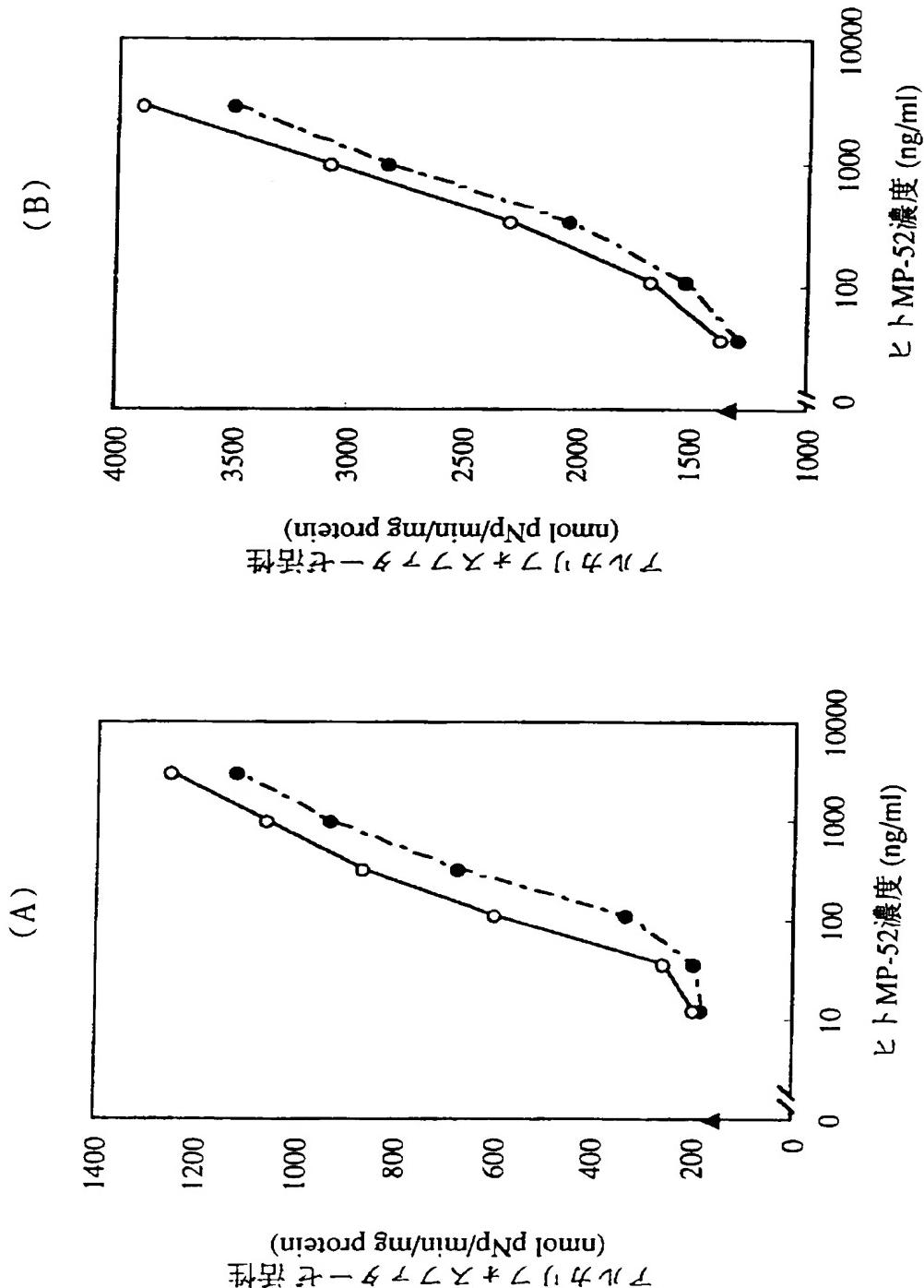
図2は実施例4で得られた本発明単量体蛋白質とヒトMP52二量体の骨芽細胞分化誘導活性を比較したグラフであり、(A)はMC3T3-E1細胞における活性を、(B)はATDC5細胞における活性を示す。図2において、白丸は本発明単量体蛋白質の活性を、黒丸はヒトMP52二量体の活性をそれぞれ示す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 軟骨・骨疾患の予防または治療に有効な単量体蛋白質を提供することを目的とする。

【解決手段】 上記目的はTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する蛋白質の二量体形成に係わるシスティンを他のアミノ酸に置き換えたアミノ酸配列を有する単量体蛋白質によって達成される。この単量体蛋白質は相当する二量体蛋白質に比べて、骨芽細胞株に対し2倍の分化誘導活性を有する。置き換えられるべき他のアミノ酸としては、セリン、スレオニン、アラニン、バリンなどが挙げられ、特にアラニンが好ましい。上記蛋白質は、それを発現しうるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞を用いて製造される。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596124690  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目17番51号  
【氏名又は名称】 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091731  
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
【氏名又は名称】 すばる特許事務所  
高木 千嘉

【選任した代理人】

【識別番号】 100080355  
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
【氏名又は名称】 すばる特許事務所  
西村 公佑

出願人履歴情報

識別番号 [596124690]

1. 変更年月日 1998年 1月26日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都港区赤坂二丁目17番51号

氏 名 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

